

みにれびゅう

タンパク質工学を駆使した高機能性二重特異性抗体の開発

浅野 竜太郎, 熊谷 泉

1. はじめに

抗体分子は単一の結合特異性を有することが特徴の一つであるが、組換え技術を用いることで異なる二つの特異性を有する二重特異性抗体を創出することが可能であり、さらに近年では天然にも存在することがわかってきた。異分子間を架橋させることができるためさまざまな分野での応用も考えられるが、歴史的には医用、特に効果的ながん治療薬としての開発に大きな期待が寄せられてきた。薬物送達システム製剤を目指す場合、一方にがん細胞に特異的な抗体、もう一方に薬剤や放射性物質、あるいは細胞傷害活性を有する毒素や酵素などに特異的な抗体が用いられる。がん細胞上の異なる受容体や、同一受容体上でも異なるエピトープを標的とすることで高い治療効果が得られることもあるが、古くから、がん細胞とリンパ球間の強制的な架橋を狙った設計が広く進められてきた。1980年代にはすでにヒトへの投与が行われたが、マウス抗体であったことと調製法、それぞれに起因する抗原性とコスト高が問題となった。このため低抗原性化と微生物を用いた安価な製造を目的に低分子形態の設計が進められたが、ヒト由来の抗体断片が容易に扱えるようになり、また発現系の違いによる製造コストの差が縮まったことから、より高機能な高分子形態の設計も積極的に行われるようになった。これまでに考案された二重特異性抗体の形態は少なくとも50前後はあり、2009年には、世界で初めての二重特異性抗体医薬が欧州で認可されるに至っている¹⁾。本稿では二重特異性抗体の開発の歴史と、タンパク質工学を駆使したその高機能化に向けた我々の取り組みを紹介したい。

2. 二重特異性抗体の作製のあゆみ

1960年代初頭には、すでに二重特異性抗体の人工的な作製に関する可能性が示されていたが、任意の二つの特異性を有する抗体の調製となると、1970年代のハイブリドーマ技術の確立以降となる。まず2種のハイブリドーマどうしを融合させるクワドローマ法が考案されたが、異なる抗体の重鎖と軽鎖間の会合などにより9種類の副産物が生じてしまうため、たとえばそれぞれの標的抗原を固定化させたカラムを用いた2段階のアフィニティー精製が必要となる(図1a)。唯一認可されている二重特異性抗体医薬 Catumaxomab は、このクワドローマ法を用いて調製されているが、マウスとラット由来の重鎖と軽鎖が共存する場合、互いに異種間での会合は生じず、さらにラット由来のIgG2はプロテインAにほとんど結合しないという特性を利用することで、比較的簡便な精製が可能となっている(図1b)。しかしながらヒトでの抗原性の高さから繰り返し投与は困難で、またクワドローマからは十分な産生量を得ることができない。1996年に重鎖間のヘテロな会合を促進させる試みとして、CH3領域へ導入する knobs-into-holes (KiH) 変異が開発されたが、重鎖と軽鎖間の会合は制御できないため、3種類の副産物が生じてしまう(図1c)。その後、それぞれの異なる重鎖に対して共通の軽鎖をファージ提示法で選択する手法が考案され、KiH変異と組み合わせることで、理論上は目的とする二重特異性抗体のみを調製することが可能になったが、KiH変異が介するCH3のヘテロ会合は必ずしも完全ではなく、また共通軽鎖の取得も容易ではない(図1d)²⁾。一方、当初から化学合成による調製も進められてきた。ヒンジ領域のジスルフィド結合を還元後、同種での再会合を防ぐように化学的に処理した後に混合することで均一な二重特異性抗体を作製することができる³⁾。この合成法の確立により臨床研究も進められたが、当時はやはりマウス抗体であったためヒトでの抗原性や、また現在でも抗体医薬自体、動物細胞を用いた製造に起因する薬価の高さが大きな問題となっており、2種類の抗体を用いた低収量かつ煩雑な二重特異性抗体の合成は、医薬化の大きな妨げとなった。

東北大学大学院工学研究科バイオ工学専攻 (〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-11-608)

Development of highly functional bispecific antibodies using protein engineering

Ryutaro Asano and Izumi Kumagai (Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University, Aoba 6-6-11, Aramaki, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8579, Japan)

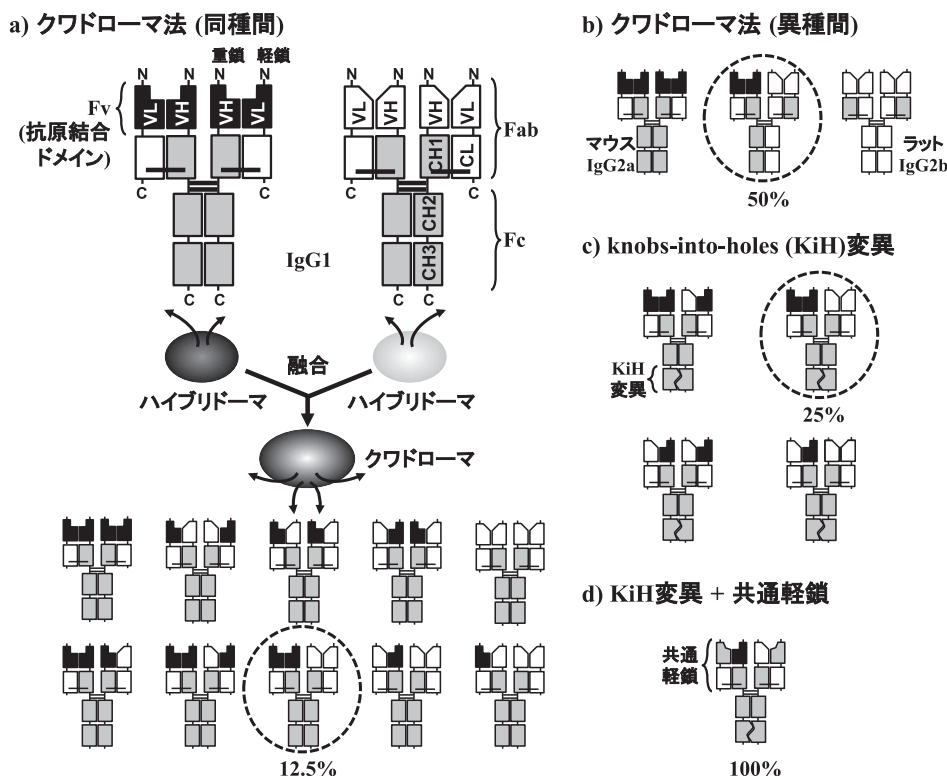


図1 抗体の模式図と二重特異性抗体の作製法の変遷
%は組みうる会合が等価に生じると仮定した場合の値。

3. タンパク質工学を駆使した二重特異性抗体の作製

従来の二重特異性抗体の一つの問題点として、天然型抗体が2価で結合するのにに対し、1価とならざるをえないことに起因する親和性の低下があげられる。このため後述する我々の取り組みも同様であるが、各々の抗原に対して多価の結合が期待できる非天然型の二重特異性抗体の開発が広く行われてきた²⁾。図2aにごく一例を示すが、いかに抗体分子が自由な発想に基づく組換えが可能であるかがうかがえる。一方、生産性を考えると、天然型抗体がg/Lオーダーでの調製が可能であるのに対し、非天然型はその10分の1の収量を得るのも困難である。このため天然型の二重特異性抗体の開発も根強く行われており、たとえば上述の共通軽鎖の取得に変わる技術として、近年一方のFabの軽鎖全体、あるいは一部を対応する重鎖と入れ換える crossover 技術が報告された (図2b)⁴⁾。またモデリングに基づく変異導入や、IgGとIgAのCH3配列を組み合わせることで、KiH変異に比べて、いっそう厳密なヘテロ会合の制御も達成されており⁵⁾、今後これらの技術の組み合わせによる、より均一かつ簡便な二重特異性抗体の調製に期待が持たれる。また以前から、IgG4抗体の中には、標的抗原に対して2価性の結合を示さない分子が存在するこ

とが示唆されていたが、IgG4のヒンジ領域は解離と再会合が起こりやすく、生体内でも異なるIgG4間の交換反応により、二重特異性抗体が生じていることが実験的に示された⁶⁾。一方で、IgG4の重鎖と軽鎖間には解離しにくいという特性を生かし、最小限の変異導入で重鎖間の会合の平衡をヘテロに偏らせる試みもなされている⁷⁾。

4. 機能的な低分子二重特異性抗体の開発

我々も新規がん治療抗体の開発を目的に、がん細胞とリンパ球を標的とした二重特異性抗体、特にその形態として微生物でも調製可能な低分子の diabody 型二重特異性抗体に着目し研究を進めてきた。まずMx3と名づけた、がん関連抗原であるムチンコアタンパク質の一つMUC1とT細胞上のCD3を標的としたdiabodyを作製した結果 (図3a)、濃度に依存したがん細胞の傷害活性が観察された。続いて、T細胞の強力な賦活能を有する変異型スーパー抗原mSEAを融合させたmSEA-Mx3を作製したところ (図3b)、期待どおりの抗腫瘍効果の増強が達成されたが、黄色ブドウ球菌由来のmSEAは治療薬としては、その抗原性が懸念される。一方、並行してさまざまな抗体を組み合わせ、diabodyを作製し評価した結果、Ex3と名づけたヒト上皮増殖因子受容体(EGFR)とCD3を標的とした分子

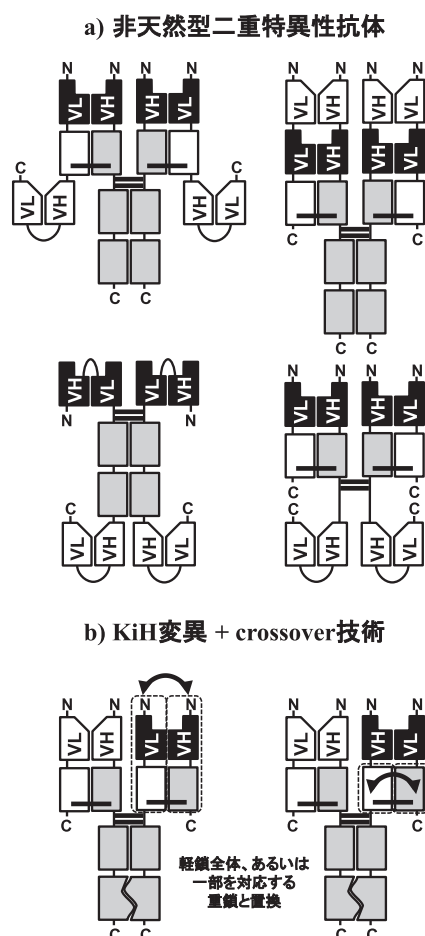


図2 タンパク質工学技術を駆使した二重特異性抗体の設計

(図3c)に最も強力な抗腫瘍効果がみられ、単独で mSEA-Mx3 を凌ぐ効果を示した⁸⁾。より機能的な二重特異性抗体の創製においては、標的とする抗原や使用する抗体の選択、さらにはこれらの組み合わせが重要であるといえる。大腸菌をはじめとする微生物を用いた製造は、現在では必ずしもコスト面で有利であるとはいえないが、このように有望なシーズの創製には種々の検討が必要であるため、遺伝子工学的な改変が容易である点、すなわち発現ベクターの作製から比較的短期間で機能評価が可能であることは、低分子型の大きな利点である。一方で、大腸菌を用いて組換えタンパク質を調製しても、不溶性の沈殿としてしか得られないことがあり、巻き戻し操作が余儀なくされる。抗体医薬の最終的な製造法として採用された例はないが、開発段階においては有用で我々も活用しており、動物細胞を用いて調製した Ex3 との比較により機能に遜色がないことを確認している⁹⁾。

5. 低分子二重特異性抗体の高機能化

Ex3 は、極力ヒト由来の配列に近づけるためのヒト型化

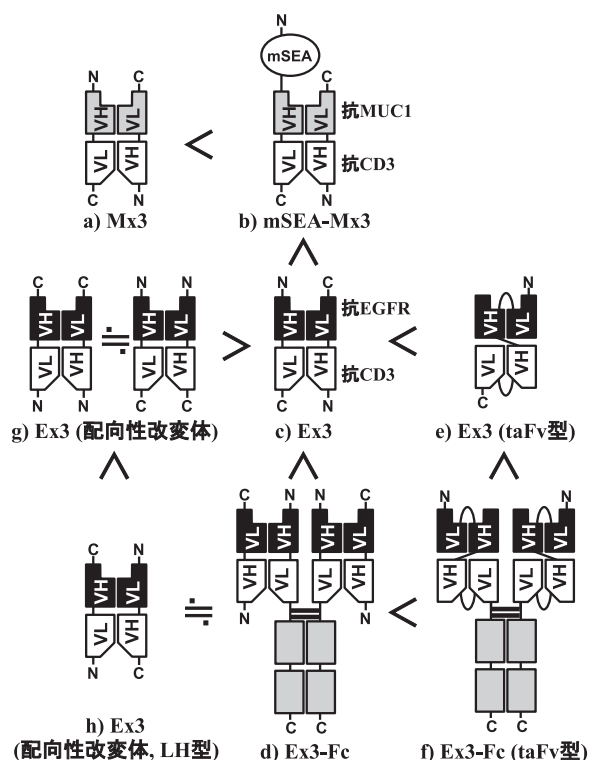


図3 低分子二重特異性抗体の開発と高機能化

不等号は *in vitro* におけるがん細胞傷害活性のおおよその強弱を示す。

も終了しており¹⁰⁾、臨床での効果を確認したい分子ではあるが、我々はさまざまな観点からのさらなる高機能化も進めてきた。ヒト Fc 領域の融合は、高分子量化により血中半減期の延長が期待できるほか、プロテイン A を用いたアフィニティー精製が可能となるため、抗原性が懸念される精製のペプチドタグを付加させる必要がなくなる。また抗体医薬の主な作用機序として知られる抗体依存性細胞傷害活性などのエフェクター機能は Fc 領域が担っており、さらに Fc 領域がホモ二量体であることから融合分子も 2 分子となるため多価化も達成できる。実際に Ex3 に Fc 領域を融合させた結果、期待どおりの末梢血リンパ球の増殖効果の付加や、Ex3 が 2 分子となったことによる親和性の向上、およびがん細胞傷害活性の増強がみられた (図3d)¹¹⁾。一方、これまでに低分子型二重特異性抗体に関してさまざまな形態が開発されてきたが、汎用的に用いられているのは互いに構成ドメインは同一で、連結順のみが異なる diabody 型と tandem scFv (taFv) 型である。前者の方が構造安定性が高く大腸菌でも比較的調製しやすいとされるが、後者の構造的な自由度の高さが、より強い活性をもたらしうることが知られており、我々も taFv 型に改変した Ex3 の機能評価を行うことで確認している (図3e)¹²⁾。Fc 領域を融合させることで、やはり効果の上積みを観察しており (図3f)、このような積木細工的な高機能化は組

換え抗体開発の魅力の一つといえ、機能性ドメインに切り分けることで、その最適化に大腸菌発現系を用いることも可能である。実際 diabody 型に限っても、ドメインの連結順を変えることで4種類の配向性が考えられるが、これらすべてを大腸菌を用いて調製したところ、いずれも活性が向上することが明らかになった。特に両 VL ドメインを N 末端に配置した LH 型に顕著な活性の向上がみられ、Fc 融合 Ex3 や taFv 型と同等の効果を示した (図 3g, h)¹³⁾。詳細なメカニズムはまだ不明であるが、配向性を改変することで構造が変化し、柔軟性の高い taFv 型が取りうる架橋に有利な構造を LH 型は有していると考えている。

6. おわりに

二重特異性抗体が米国食品医薬品局に認可された例はいまだないが、着実な進展はみられており、現在も 10 以上のシーズの臨床試験が続けられている¹⁾。しかしながら、その形態や作用機序はさまざまであり、どの戦略が最も優れているかを議論するにはまだ早く、我々の例でもみられるように、使用する抗体や配向性が異なるだけでも活性の増減がみられるため、現状ではやはり試行錯誤は避けられない。一方で、特にタンパク質製剤は薬効が十分でも安定性評価や製造プロセス開発でドロップアウトするリスクが高いため、開発段階の早期にこれらを検討すべきとの声もあるが、医薬品シーズの探索には寄与できても、ダウンストリーム開発にアカデミアが貢献できることは限られている。Fc 領域を有さない低分子型であっても既存の抗体医薬に対して、実に有効濃度が 5 桁も低いという先行臨床試験の結果も報告されていることから¹⁴⁾、年々興味を示す企業が増えているように感じている。今後いつそう大きな潮流となり、本邦でも二重特異性抗体の実用化が進むことを期待したい。

1) Byrne, H., Conroy, P.J., Whisstock, J.C., & O'Kennedy, R.J. (2013) *Trends Biotechnol.*, 31, 621-632.

- 2) Kontermann, R.E. (2012) *MAbs*, 4, 182-197.
- 3) Nitta, T., Sato, K., Yagita, H., Okumura, K., & Ishii, S. (1990) *Lancet*, 335, 368-371.
- 4) Schaefer, W., Regula, J.T., Bahner, M., Schanzer, J., Croasdale, R., Durr, H., Gassner, C., Georges, G., Kettenberger, H., Imhof-Jung, S., Schwaiger, M., Stubenrauch, K.G., Sustmann, C., Thomas, M., Scheuer, W., & Klein, C. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 11187-11192.
- 5) Davis, J.H., Aperlo, C., Li, Y., Kurosawa, E., Lan, Y., Lo, K. M., & Huston, J.S. (2010) *Protein Eng. Des. Sel.*, 23, 195-202.
- 6) van der Neut Kolfschoten, M., Schuurman, J., Losen, M., Bleeker, W.K., Martinez-Martinez, P., Vermeulen, E., den Bleker, T.H., Wiegman, L., Vink, T., Aarden, L.A., De Baets, M.H., van de Winkel, J.G., Aalberse, R.C., & Parren, P.W. (2007) *Science*, 317, 1554-1557.
- 7) Klein, C., Sustmann, C., Thomas, M., Stubenrauch, K., Croasdale, R., Schanzer, J., Brinkmann, U., Kettenberger, H., Regula, J.T., & Schaefer, W. (2012) *MAbs*, 4, 653-663.
- 8) Hayashi, H., Asano, R., Tsumoto, K., Katayose, Y., Suzuki, M., Unno, M., Kodama, H., Takemura, S., Yoshida, H., Makabe, K., Imai, K., Matsuno, S., Kumagai, I., & Kudo, T. (2004) *Cancer Immunol. Immunother.*, 53, 497-509.
- 9) Asano, R., Sone, Y., Ikoma, K., Hayashi, H., Nakanishi, T., Umetsu, M., Katayose, Y., Unno, M., Kudo, T., & Kumagai, I. (2008) *Protein Eng. Des. Sel.*, 21, 597-603.
- 10) Asano, R., Sone, Y., Makabe, K., Tsumoto, K., Hayashi, H., Katayose, Y., Unno, M., Kudo, T., & Kumagai, I. (2006) *Clin. Cancer Res.*, 12, 4036-4042.
- 11) Asano, R., Kawaguchi, H., Watanabe, Y., Nakanishi, T., Umetsu, M., Hayashi, H., Katayose, Y., Unno, M., Kudo, T., & Kumagai, I. (2008) *J. Immunother.*, 31, 752-761.
- 12) Asano, R., Ikoma, K., Shimomura, I., Taki, S., Nakanishi, T., Umetsu, M., & Kumagai, I. (2011) *J. Biol. Chem.*, 286, 1812-1818.
- 13) Asano, R., Kumagai, T., Nagai, K., Taki, S., Shimomura, I., Arai, K., Ogata, H., Okada, M., Hayasaka, F., Sanada, H., Nakanishi, T., Karvonen, T., Hayashi, H., Katayose, Y., Unno, M., Kudo, T., Umetsu, M., & Kumagai, I. (2013) *Protein Eng. Des. Sel.*, 26, 359-367.
- 14) Bargou, R., Leo, E., Zugmaier, G., Klinger, M., Goebeler, M., Knop, S., Noppeney, R., Viardot, A., Hess, G., Schuler, M., Einsele, H., Brandl, C., Wolf, A., Kirchinger, P., Klappers, P., Schmidt, M., Riethmuller, G., Reinhardt, C., Baeuerle, P.A., & Kufer, P. (2008) *Science*, 321, 974-977.

著者寸描

●浅野 竜太郎（あさの りゅうたろう）



東北大学大学院工学研究科バイオ工学専攻
准教授。博士（工学）。

■略歴 1976年愛知県に生る。99年東北
大学工学部卒業。2000年同大学院工学研
究科博士課程前期課程中途退学後、同大学
加齢医学研究所附属医用細胞資源センター
助手。02年同大学院工学研究科バイオ工

学専攻助手、07年同助教を経て、11年より現職。

■研究テーマと抱負 がん治療を目的とする二重特異性抗体を
中心に医用を最終目的とする高機能な人工タンパク質の多角的
視点に基づく開発を行っています。

■趣味 旅行、映画、スポーツ観戦。